

# Über die Einwirkung von Jodmethyl auf Casein

von

Zd. H. Skraup und E. Krause.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 6. Mai 1909.)

Die Einwirkung von salpetriger Säure auf Proteine hat gezeigt, daß der Lysinrest und zum Teil auch der Argininrest eine Veränderung erfährt, derart, daß bei der Hydrolyse der »Desaminproteine«, die durch salpetrige Säure aus den Proteinen entstehen, Lysin überhaupt nicht nachweisbar ist und das Arginin zumeist nur in verminderter Menge.

Aus diesen Tatsachen wurde der Schluß gezogen, daß das Lysin (und teilweise auch das Arginin) im Proteinmolekül eine freiliegende Aminogruppe besitzt.

J. v. Braun<sup>1</sup> hat dagegen eingewendet, daß nach den Untersuchungen von E. Fischer und Kölker<sup>2</sup> aus Peptiden durch salpetrige Säure auch der Stickstoff einer Iminogruppe eliminiert werden kann. Und wie dieses nur unter vorhergehender Hydrolyse möglich ist, könnte eine solche auch bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf Proteine eintreten. Tritt diese aber ein, ist der von uns gezogene Schluß auf freie Aminogruppen unhaltbar. Dieser Einwand läßt sich bei der gegenwärtigen experimentellen Sachlage weder entkräften noch beweisen, aber selbst wenn letzteres gelingen sollte, wird das Wesentliche nur verschoben, nicht geändert. Die von

---

<sup>1</sup> Mediz.-naturw. Archiv, Bd. II, 172.

<sup>2</sup> Liebig's Ann., 340 (177), 1905.

dem einen von uns und seinen Mitarbeitern gemachten Beobachtungen würden dann bedeuten, daß an solchen Stellen der Proteine, in welchen das Lysin (und Arginin) peptidartig gebunden ist, viel leichter Hydrolyse eintritt als an anderen. Das wesentliche Ergebnis, die Bindung des Lysins (und Arginins) im Proteinmolekül sei anderer Art wie die der meisten übrigen einfachsten Bestandteile, bliebe bestehen.

Das Prinzip, von dem wir ausgegangen sind, an den Proteinen chemische Veränderungen vorzunehmen und durch Hydrolyse festzusetzen, an welchen Resten solche eingetreten ist, wird nicht verrückt.

In weiterer Anwendung dessen haben wir die Einwirkung von Jodmethyl auf Casein untersucht.

Ob diese Reaktion jemals studiert worden ist, konnten wir in der Literatur nicht auffinden. Es war für sie von vornherein folgendes wahrscheinlich.

Sind im Protein Aminogruppen frei und nicht in peptidartiger Bindung, dann ist anzunehmen, daß Methylierung in ihnen am leichtesten erfolgt. Bei erschöpfender Behandlung könnten sogar quaternäre Jodide entstehen.

Methylierung ist aber auch in Iminogruppen möglich, mit anderen Worten: auch bei peptidartiger Verkettung. Auf alle die Möglichkeiten, die sich voraussetzen lassen, einzugehen, hätte wenig Bedeutung. Nur das eine darf wohl erwähnt werden, daß, wenn das Protein tatsächlich methyliert wird und sich bei seiner vollständigen Hydrolyse herausstellt, daß gewisse einfachste Bestandteile wieder und in derselben Menge entstehen wie aus dem unveränderten Protein, für diese Bestandteile der Beweis erbracht ist, daß sie im Protein vor der Methylierung geschützt sind. Wenn dagegen andere Bestandteile nach der Hydrolyse nicht wieder auftreten, dann kann geschlossen werden, daß sie methyliert worden sind und für diese Reste ein ähnlicher Schutz nicht besteht. Selbstverständlich wäre es von noch größerem Ausschlage, gelänge es, die durch Methylierung veränderten einfachsten Spaltungsstücke in Substanz zu isolieren. Es sei bemerkt, daß letzteres uns leider nicht gelingen wollte.

Die Methylierung erfolgte mit Hilfe von alkoholischer Kalilauge in der Wärme; es war deshalb nicht unmöglich, daß sie von einem Zerfalle des Proteins begleitet ist, wie er durch wässrige Lauge erfolgt.

Selbst wenn ein solcher anzunehmen ist, wird das Vor erwähnte nicht berührt. Er ist aber auch sehr wenig wahrscheinlich.

Einmal ist die Ausbeute recht beträchtlich. Man bekommt trotz der umständlichen Reinigung, vom Gewicht des Caseins gerechnet, über 40% der vielfach umgefällten Substanz. Zweitens steht diese in ihrer Zusammensetzung dem Casein sehr nahe.

Rechnet man die Mittelzahlen der Analysen derart um, daß für  $\text{CH}_3\text{O}$  und für das Stickstoffmethyl je ein  $\text{CH}_2$  und außerdem noch der Jodgehalt in Abzug kommt, so erhält man für die Stammsubstanz folgende Prozentzahlen, welchen wir die Mittelwerte für das Casein selbst beisetzen, wie sie sich nach den im Cohnheim'schen Lehrbuch aufgenommenen Analysen berechnen.

	Stammsubstanz des methylierten Caseins	Casein <sup>1</sup>
C.....	53·6	53·26
H.....	6·8	7·06
N.....	15·8	15·70
S.....	0·76	0·77
P.....	0·95	0·84
O.....	22·7	22·37

Alle Zahlen stimmen gut überein, ein Unterschied ist selbst für den Phosphor nicht vorhanden.

Es ist deshalb anzunehmen, daß abgesehen von der Methylierung ein tiefergehender Eingriff nicht erfolgt ist.

Das methylierte jodhaltige Casein entsteht in zwei Arten, von denen die eine in Wasser sehr leicht, die andere schwer, dafür in sehr verdünntem Alkohol löslich ist. Eine völlige Reinigung dieser zwei Substanzen, insbesondere der in Wasser

<sup>1</sup> Beim Casein haben wir eine Abrechnung des von uns ermittelten Gehaltes an  $\text{OCH}_3$  und  $\text{NCH}_3$  nicht vorgenommen. Siehe darüber den experimentellen Teil.

leicht löslichen, ist natürlich so gut wie unmöglich. Die leichter lösliche erwies sich als jodärmer, mitunter war sie fast jodfrei. Da wir das Mengenverhältnis der verschiedenen löslichen Arten sehr wechselnd fanden, die schwerer lösliche, wie sich zeigte, in die leichter lösliche übergeht (dieses sogar wiederholt beim Aufbewahren im geschlossenen Gefäße), haben wir auf die ohnedies nur sehr annähernde Trennung ganz verzichtet.

Bei den Jodbestimmungen fanden wir, daß der Jodgehalt geringer gefunden wird, wenn man im Tiegel mit Soda verglüht als mit überschüssigem Ätzkalk im Rohre (bei einem Präparat 2·74%, beziehungsweise 3·49%). Es schien nicht unmöglich, daß dieses daher rührt, daß das Jod teilweise wenigstens in quaternärer Form gebunden ist. Diese Vermutung fand auch eine Stütze in anderen Beobachtungen. Bei der Hydrolyse mit relativ konzentrierter Schwefelsäure wurde kein freies Jod abgeschieden, ebenso nicht bei allen folgenden Operationen, und in den letzten Mutterlaugen, die nach Veresterung in Salzsäure, Abschütteln der Ester etc. auftreten, war starker Jodgehalt noch nachzuweisen. Wir fanden aber andererseits, daß, wenn das Jodid in verdünntem Alkohol gelöst, mit Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt und dann wiederholt mit Ammonsulfat ausgesalzen wird, die Fällung dann kein Jod mehr enthält. Ob das Jod lediglich als Jodwasserstoffsäure oder auch noch in anderer Art gebunden ist, läßt sich daher vorläufig nicht sicher entscheiden.

Die Hydrolyse zeigte, daß aus dem methylierten Casein Tyrosin und Lysin überhaupt nicht, Histidin und Arginin, wenn überhaupt, so in viel geringeren Mengen zu gewinnen sind als aus dem Casein selbst (Histidin 0·02% statt 2·6% und Arginin 0·2% statt 4·8% wie im Casein). Glutaminsäure und Leucin wurden aber in sehr erheblicher Menge erhalten (Glutaminsäure 10%; ein Vergleich ist beim Leucin nicht möglich, da die Menge desselben im Casein nicht genau ermittelt ist).

Phenylalanin fanden wir als Chlorhydrat mehr, als für das Casein angegeben ist, rund 6% gegen 3·8%. Doch war unser Präparat nicht rein.

Mit dem Verschwinden des Tyrosins steht auch das Versagen der Millon'schen Reaktionen in Zusammenhang.

Die Biuretreaktion, die Reaktion nach Molisch mit  $\alpha$ -Naphthol und Thymol treten beim Methylieren von Casein in gleicher Intensität wie beim Casein ein. Die Liebermann'sche Reaktion ist beim methylierten Casein schwächer, die Glyoxylsäurereaktion dagegen viel stärker.

Demnach ist man berechtigt anzunehmen, daß bei der Methylierung die Reste der Glutaminsäure und des Leucins (vielleicht auch des Phenylalanins) nicht Anteil nehmen, dagegen die des Tyrosins und der Hexonbasen reagieren. Worauf dieser Unterschied zurückzuführen ist, kann vorläufig nicht entschieden werden.

Man könnte unter anderem annehmen, daß diese Differenz auf sehr einfacher konstitutiver Verschiedenheit beruht. Daß z. B. schon ganz einfach zusammengesetzte Peptide, die Leucin- und Glutaminsäure enthalten, bei der Einwirkung von Jodmethyl in dem Leucin- und Glutaminrest intakt bleiben, solches aber für Peptide, die Tyrosin und Hexonbasen enthalten, nicht gilt. Der Unterschied wäre dann für die Konstitution des Proteins nicht von Belang; er wäre dann nur ein negatives Charakteristikum für Leucin und Glutaminsäure und ein positives für die anderen Aminverbindungen.

Wir verschieben weitere Betrachtungen, bis noch andere methylierte Proteine untersucht sind und bis wir an synthetischen Polypeptiden den Verlauf der Methylierung untersucht haben, möchten aber unsere Meinung dahin abgeben, daß wir die früher erwähnte einfachste Deutung nicht für die wahrscheinlichste halten.

## Experimenteller Teil.

### Untersuchung des Caseins auf Methoxyl und Stickstoffmethyl.

Ob im Casein oder überhaupt einem Protein Methyl an Sauerstoff oder Stickstoff gebunden ist, wurde unseres Wissens bisher nicht untersucht.

Für die beabsichtigte Untersuchung war eine Feststellung dieser Verhältnisse notwendig. Das käufliche Casein nach

Hammarsten erwies sich auch nach 14stündigem Trocknen im Vakuum bei 80 bis 90° als methoxylhaltig.

0·828 g gaben 0·0510 g AgJ = 0·81% CH<sub>3</sub>O.

Da es nicht ausgeschlossen war, daß vom Entfetten her Reste von Äther oder Alkohol zurückgehalten werden, welche bei der Methoxylbestimmung stören, wurde das Präparat zu wiederholtenmalen in der eben nötigen Menge von Soda gelöst und mit Essigsäure wieder ausgefällt. Das sorgfältig gewaschene Präparat wurde zunächst an freier Luft, dann bei 100 bis 105° durch 3 Stunden bei einem Drucke von 10 bis 15 mm getrocknet.

Der Methoxylgehalt hatte sich nicht geändert.

0·5592 g gaben 0·0359 g AgJ = 0·85% CH<sub>3</sub>O.

Dieselbe Substanzmenge wurde weiter zur Bestimmung des Stickstoffmethyls verwendet.

Erhitzt bis 230° .....	0·0608 g AgJ	0·69% CH <sub>3</sub>
» » 280 bis 290° .....	0·0385 g »	0·44% »
» » 310° .....	gelbe Dämpfe, aber kein Jodsilber	1·13% Gesamt-CH <sub>3</sub>

Danach kann man im Casein eine kleine Menge von Methoxyl und von Stickstoffmethyl annehmen. Soweit diese kleinen Zahlen eine Berechnung zulassen, ließe sich schließen, daß auf eine OCH<sub>3</sub>-Gruppe 4 CH<sub>3</sub> kommen und daß auf Grund dieser Zahlen für das Casein als kleinstes Molgewicht sich rund 3500 berechnet.

Dabei muß aber doch in Betracht kommen, daß bei den Methoden zur Bestimmung der Methylgruppen eine Hydrolyse des Caseins sicher stattfindet, daß diese zum Teil bis zu den einfachsten Aminoverbindungen fortschreiten dürfte und daß, wie wir gefunden haben, das Erhitzen dieser mit Jodwasserstoffsäure flüchtige Jodide liefert.

Leucin gab bei der Methoxylbestimmung kein Jodsilber, beim Erhitzen auf 310 bis 350° nach Herzig-Meyer aber

kleine Mengen, die bei Wiederholung des Versuches sich nicht mehr vermehrten. Der Einfachheit halber rechnen wir auf Methyl um.

0·2177 g gaben 0·0491 g AgJ = 1·45% CH<sub>3</sub>.

Glutaminsäure gab schon bei der Methoxylbestimmung Jodsilber. Das Präparat ist aus mehrfach umkrystallisiertem Chlorhydrat mit Silberoxyd dargestellt worden, welches Verfahren der Zerlegung mit Ammoniak vorzuziehen ist.

0·3236 g bis 130° erhitzt, gaben 0·0077 g AgJ = 0·31% CH<sub>3</sub>O,  
 » 360° » » 0·0291 g » = 0·57% CH<sub>3</sub>,  
 wieder » 360° » » 0·0120 g » = 0·24% CH<sub>3</sub>.

Es sei noch bemerkt, daß sowohl Leucin als Glutaminsäure bei Bestimmung des Methylstickstoffes braune Dämpfe geben, die sich in dem Waschgefäße zu braunen Tröpfchen kondensieren. In einem Falle gelang es, nachzuweisen, daß das Öl Jod enthält.

In Berücksichtigung der Zahlenunterschiede und aller sonst hier in Betracht kommenden Momente ist aber anzunehmen, daß der beim Casein beobachtete Gehalt an OCH<sub>3</sub> und NCH<sub>3</sub> zum größeren Teile dem Protein selber zukommt und nicht aus sekundären Produkten stammt.

Bei den Vorversuchen zeigte sich, daß fein gepulvertes Casein zur Lösung bei Gegenwart von Wasser viel weniger Ätzkali braucht als bei Gegenwart von Alkohol.

Je 1 g Casein mit 5 cm<sup>3</sup> Wasser verrührt, löste sich langsam in der Kälte, rasch bei Wasserbadtemperatur, nach Zusatz von 0·1 cm<sup>3</sup> 10prozentiger wässriger Lauge teilweise, fast vollständig in 0·3 cm<sup>3</sup>. In der Kälte erstarrten die Lösungen zu steifen Gallerten.

Unter gleichen Verhältnissen, aber bei Ersatz des Wassers durch 96prozentigen Alkohol trat erst bei 2·5 cm<sup>3</sup>, d. i. also der sechsfachen Menge Ätzkali, Lösung ein; auch hier bleibt eine leichte Trübung, die auch bei weiterem Zusatze nicht verschwindet. Die erkaltenden Lösungen erstarren auch bei Gegenwart von Alkohol zu Gallerten.

Da es erwünscht war, das Wasser möglichst auszuschließen, haben wir die Einwirkung von Jodmethyl auf die alkoholische alkalische Caseinlösung vorgenommen. Die Hauptschwierigkeit war, das Zusammenbacken des Caseins zu verhindern, was bei Arbeiten in kleinem Maßstabe leicht gelingt, nicht aber bei größeren Mengen. Am leichtesten wird die Bildung solcher auch bei längerem Erwärmen unverändert bleibender gelatinöser Mengen vermieden, wenn man wässerigen Alkohol verwendet. Es zeigte sich aber dabei eine nicht ganz aufgeklärte Erscheinung. Während bei Anwendung von 96 bis 100% Alkohol Substanzen entstanden, die Jod enthielten und deren Jodgehalt auch bei sonst wechselnden Bedingungen ziemlich gleich blieb (bis 5%), so waren die bei Anwendung stark wässerigen Alkohols entstandenen Präparate viel ärmer an Jod, ja frei von Jod.

Es gelang schließlich, auch bei Anwendung von absolutem Alkohol Verteilung zu erzielen, und erwies sich das weiter unten beschriebene Verfahren als ganz bequem.

Bei den ersten Versuchen wurde nach Entfernung von überschüssigem Jodmethyl und Alkohol in Wasser geworfen, wobei ungefähr die Hälfte des Reaktionsproduktes als in Wasser schwer lösliches Harz ausfiel. Die wässrige Lösung, konzentriert und mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ausgesalzen, gab eine Abscheidung, die zum geringeren Teil in Wasser schwer, zum größeren aber leicht löslich war.

Aus Gründen, die in der Einleitung schon erwähnt worden sind, haben wir auf die ohnedies sehr unvollkommene Trennung der beiden Substanzen verzichtet und weiterhin folgenden Weg eingeschlagen.

50 g Casein werden mit 100  $\text{cm}^3$  absolutem Alkohol in einer Reibschale gut durchgerührt, in einen geräumigen Rundkolben gespült und mit einer Lösung von 13 g KOH in 25  $\text{cm}^3$  absolutem Alkohol in kleinen Portionen unter heftigem Schütteln vermischt. Man erhält darauf eine nur wenig getrübe Lösung, in der Casein nicht mehr zu sehen ist. Dann werden 50 g Jodmethyl zugesetzt und am Rückflußkühler erhitzt bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion, was nach etwa 2 Stunden der Fall ist. Sodann wird dieselbe Menge KOH in Alkohol



und Jodmethyl noch einmal zugesetzt und abermals bis zur Neutralität erhitzt. Sobald die Flüssigkeit nicht mehr alkalisch reagiert, wird das unverbrauchte Jodmethyl und der Alkohol abdestilliert, bis das Destillat mit Wasser keine Trübung mehr gibt, und der Rückstand mit 500  $cm^3$  kochendem Wasser übergossen, wobei ein Teil ungelöst bleibt. In die Lösung wird unbekümmert um die Abscheidung festes Ammonsulfat eingetragen, bis die Fällung beendet ist, wozu rund 190 g genügen. Nach dem Erkalten wird abgegossen. Die Fällung wird in dem dreifachen Gewichte 10prozentigen heißen Alkohols vollständig in Lösung gebracht und neuerdings mit Ammonsulfat ausgefällt. Dieses Umfällen wird wiederholt, bis in der Ammonsulfatlösung nichts Fixes nachweisbar ist, wozu fünf Fällungen genügen; wir haben vorsichtshalber noch eine sechste ausgeführt.

Auf diese Weise wurden 350 g Casein verarbeitet. Die Methylierung wurde in sieben verschiedenen Operationen vorgenommen, die Ausfällungen mit dem vereinigten Material.

Das Gewicht der beim Aussalzen sich abscheidenden ersten Fällung betrug 837 g. Dieses Mehrgewicht erklärt sich dadurch, daß die harzigen Abscheidungen außerordentlich viel Wasser einschließen.

Bei der zweiten Ausfällung trat eine Abnahme von 158 g ein, bei der dritten betrug die Abnahme 65 g. Nach den in analoger Weise durchgeführten vierten, fünften und sechsten Fällungen wurden die Abnahmen noch geringer.

Das Ausfällen mit Ammonsulfat bezweckt nicht nur die Beseitigung organischer Nebenprodukte, sondern auch die Abtrennung der anorganischen Salze. Ob diese vollständig weggeschafft sind, erkennt man selbstverständlich sehr einfach, wenn die abgegossene Lösung von Ammonsulfat beim Abrauchen mit Schwefelsäure keinen fixen Rückstand mehr hinterläßt. Diese Probe wird wesentlich erleichtert, wenn die Sulfatlösung vorerst mit etwa dem gleichen Volumen Alkohol vermischt wird. Die Hauptmenge des Ammoniaksalzes fällt aus und infolgedessen wird die Dauer des Eindampfens und Glühens auf die Hälfte der Zeit verkürzt. Das zur Trockene gebrachte alkoholische Filtrat wird in der Platinschale erhitzt, bis keine Dämpfe mehr auftreten, der kohlige Rückstand mit

einigen Tropfen Wasser ausgelaugt, dieses neuerdings eingedampft, der Rückstand schwach geglüht und mit Chlorbarium geprüft. Nach der fünften Ausfällung ist in der Regel ein fixer Rückstand nicht mehr nachzuweisen, doch wurde der Sicherheit halber stets noch eine weitere Umfällung vorgenommen.

Die von Alkalisalzen befreite Substanz, zirka 600 g, wurde in 10prozentigem heißen Alkohol gelöst, mit Ätzbaryt die  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in der Hitze genau ausgefällt, und zwar so, daß die Flüssigkeit genau schwefelsäure- und barytfrei war. Wir kommen auf diesen Punkt bei Besprechung der Analysen zurück. Bei der Prüfung auf  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{BaCl}_2$  entsteht leicht auch dann ein Niederschlag, wenn die Anwesenheit von Schwefelsäure ausgeschlossen werden kann. Er löste sich in solchen Fällen in überschüssigem  $\text{H}_2\text{O}$ ; die Trübung rührt jedenfalls von einem Aussalzen durch  $\text{BaCl}_2$  her.

Die von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  befreiten Lösungen wurden stark eingedampft und im Vakuum endlich ganz eingetrocknet. Das Methyljodcasein hinterblieb als kaum gefärbte schaumige Masse im Gewichte von 145 g.

Die Jodverbindung des Methylcaseins ist, zerrieben, sehr schwach gelb gefärbt. Empfindliches rotes Lackmuspapier wird durch das feuchte Präparat nicht verändert, blaues schwach gerötet. Die konzentrierte wässrige Lösung ist nahezu klar, auf Zusatz von Ammoniak erfolgt keine Trübung, eine ganz deutliche aber auf Zusatz von Schwefelsäure. Bei Zusatz einer gesättigten Lösung von Ammonsulfat ist bei etwa Halbsättigung die Ausfällung sehr reichlich. Sie wird durch Ammoniakzusatz beeinträchtigt.

Der Geschmack des Jodcaseins ist fade, ohne besondere weitere Eigentümlichkeit.

Die Farbenreaktionen werden am Schlusse der Arbeit näher beschrieben. Daß alle von uns dargestellten Präparate anfänglich in Wasser nur teilweise löslich waren, bei längerem Stehen im verschlossenen Gefäß aber vollständig löslich wurden, ist schon bemerkt worden.

Die Zusammensetzung des Methylcaseins wurde von verschiedenen Präparaten ermittelt. Wir geben im folgenden

lediglich die Zahlen, welche bei jenem gefunden wurden, welches nach der hier mitgeteilten Vorschrift dargestellt worden ist.

Bei Präparaten, die wir anders, besonders bei Anwendung von wasserhaltigerem Alkohol dargestellt haben, haben wir bloß den Jodgehalt ermittelt, der im allgemeinen kleiner gefunden wurde. Mitunter war ein solcher eben nur nachweisbar.

Die Substanz wurde vor der Analyse im Vakuum bei 100° getrocknet. Die getrocknete Substanz ist äußerst hygroskopisch.

- 0·1568 g gaben CO<sub>2</sub>: 0·3016 g, H<sub>2</sub>O: 0·1034 g.
- 0·1918 g > > 0·3696 g, > 0·1262 g.
- 0·3589 g > N: 45·1 cm<sup>3</sup> bei t = 21°, B = 746.
- 0·3154 g > > 39·2 cm<sup>3</sup> > t = 22°, B = 746.
- 0·6173 g > 0·0631 g AgJ.
- 0·4970 g > 0·0477 g >
- 0·9972 g > 0·0286 g BaSO<sub>4</sub>.
- 0·9353 g > 0·0410 g >
- 1·0106 g > 0·0464 g >
- 0·9972 g > 0·0313 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.
- 1·2159 g > 0·0379 g >

In 100 Teilen:

Gefunden					
C	H	N	J	S	P
52·46	7·38	14·32	5·51	0·39	0·88
52·55	7·36	14·12	5·18	0·60	0·87
				0·63	

Die Bestimmungen von Methoxyl gaben:

- I. 0·7027 g: 0·1084 g AgJ.
- II. 0·4869 g: 0·0766 g >
- III. 0·5944 g: 0·0683 g >
- IV. 0·6345 g: 0·0893 g >

Die Bestimmungen von Stickstoffmethyl gaben:

- II. 0·4869 g: 0·2131 g AgJ.
- IV. 0·6345 g: 0·3915 g >

	I	II	III	IV
OCH <sub>3</sub> . . . . .	2·04	2·07	1·52	1·76
NCH <sub>3</sub> . . . . .		2·79		3·93

Die Jodbestimmungen wurden nach dem Glühen mit Ätzkalk ausgeführt, die Schwefel- und Phosphorbestimmungen nach Asboth.

Den Schwefelgehalt betreffend, müssen wir uns eine gewisse Reserve auflegen. Nach den Erfahrungen der letzten Zeit über kolloide Substanzen kann es nicht wundernehmen, daß die genaue Entfernung von Schwefelsäure aus der Rohlösung des methylierten Caseins auch bei peinlicher Ausführung große Schwierigkeiten mit sich bringt. Wir sind durch Bestimmungen, auf deren Detail wir nicht eingehen, zu der Überzeugung gekommen, daß unser Präparat etwas Schwefelsäure enthielt, die, auf Schwefel umgerechnet, etwa 0.06% beträgt.

Wir haben aber auch festgestellt, daß unser Präparat auch Barium enthält, und halten es für wahrscheinlich, daß Bariumsulfat kolloidal vorhanden ist.

Einer genaueren Feststellung dieser Verhältnisse stehen ziemlich viele Wenn und Aber entgegen, auf deren Auseinandersetzung wir an dieser Stelle verzichten. Wir begnügen uns deshalb mit der Bemerkung, daß eine vorsichtige Deutung unserer Resultate dafür spricht, daß der oben angegebene Gehalt an Schwefel möglicherweise um 0.2 bis 0.3% zu hoch ist.

Infolge dieser Erfahrungen möchten wir empfehlen, die Schwefelsäure durch schwach überschüssigen Baryt zu entfernen und den Überschuß dieses mit Kohlensäure heiß auszufällen, wie wir bei den ersten Versuchen auch vorgegangen sind. Die klar filtrierte Lösung hatte, mit Schwefelsäure vermischt, niemals eine Trübung gezeigt. Wir sind von diesem Verfahren nur wegen des sehr lästigen Schäumens abgegangen. Letzteres läßt sich jedoch beim Einleiten von Kohlensäure in geschlossene Gefäße vermeiden.

Da wir von dem methylierten Casein viel weniger erhielten, als bei der Unlöslichkeit desselben in Ammonsulfat zu erwarten gewesen wäre, haben wir diesem Verluste nachgeforscht. Es zeigte sich, daß der bei der Fällung mit Baryt entstehende Niederschlag, nach sehr sorgfältigem Auswaschen geglüht, sich stark schwärzt. Die von ihm eingeschlossene organische

Substanz kann aber eine irgend erhebliche Menge nicht ausmachen.

Weiter wurden die von den Fällungen abgegossenen, Ammonsulfat haltenden Lösungen untersucht.

Die Flüssigkeit von der allerersten Ausfällung wurde bis zum reichlichen Auskrystallisieren von Ammonsulfat eingedampft und mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, wobei sich die Hauptmenge des Ammonsulfats krystallinisch absetzte. Von diesem wurde abgenutscht, mit 50prozentigem Alkohol nachgewaschen, der Alkohol zum größten Teil abdestilliert und der Rückstand vollständig eingedampft. Seine Menge betrug 191 g (KJ und Jodammon).

Das Filtrat der zweiten Ammonsulfatfällung (etwa 3 l) gab bei analoger Verarbeitung einen in 50prozentigem Alkohol löslichen Teil von 80 g. Die vereinigten zwei Rückstände schieden, mit Wasser verdünnt, etwas Harz ab. Nach Beseitigung dieser wurde wieder eingedampft und durch nochmaligen Zusatz von Alkohol kleinere Mengen von Ammonsulfat abgeschieden. Die Lösung enthielt sehr große Mengen von Jodammonium. Um festzustellen, ob neben diesem greifbare Substanzen vorhanden sind, wurde ein Teil nach dem Verjagen des Alkohols anhaltend mit Bleioxyd gekocht, bis der Geruch nach  $\text{NH}_3$  verschwunden war. Vom überschüssigen Bleioxyd und Bleijodid wurde filtriert, mit  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ -Lösung genau ausgefällt, das Filtrat mit  $\text{H}_2\text{S}$  zerlegt, wieder filtriert und eingedampft. Der Rückstand war sehr gering, so daß merkliche Mengen organischer Substanz in der Jodammonlösung nicht enthalten sein können.

### Hydrolyse des Methylcaseins.

Zweimal je 35 g, entsprechend im ganzen 65 g Trockensubstanz, wurden mit der dreifachen Menge konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und der sechsfachen Menge  $\text{H}_2\text{O}$  am Rückflußkühler 14 Stunden zum Kochen erhitzt. Nach beendeter Hydrolyse wurde das Produkt der Wasserdampfdestillation unterworfen, wobei ein nach Fettsäuren riechendes, sauer reagierendes Destillat überging (Reaktion auf  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und J negativ). Bei der Titration mit  $\frac{1}{10}$  KOH wurden 35  $\text{cm}^3$  verbraucht.

Der im Kolben verbliebene Rückstand wird mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und in dünnem Strahl zu der berechneten und in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgelösten Menge  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  zugegeben, so daß die Flüssigkeit schwach alkalisch reagiert. Von  $\text{BaSO}_4$  wurde abgenutscht, im Filtrat der geringe Überschuß an  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  genau ausgefällt, so daß die Flüssigkeit genau  $\text{H}_2\text{SO}_4$ - und barytfrei war. Dabei zeigte die Flüssigkeit, auch wenn die Reaktion mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf überschüssigen Baryt deutete, deutlich saure Reaktion. Vom  $\text{BaSO}_4$  wurde abgenutscht, der Niederschlag vom Filter genommen, verrieben und neuerlich sorgfältig ausgewaschen. In dem  $\text{BaSO}_4$  war nur äußerst wenig organische Substanz nachzuweisen.

Die von  $\text{BaSO}_4$  befreite Flüssigkeit wurde konzentriert und drei aufeinanderfolgende Krystallisationen in der Menge von 1.21, 1.41 und 2.55 g erhalten. Sie waren unter dem Mikroskop Leucin ähnlich, Tyrosin ähnliche Krystalle waren nicht wahrzunehmen, ebenso war die Reaktion mit Millon's Reagens auf Tyrosin negativ. Auch die Jodreaktion blieb aus.

Die erste Krystallisation wurde zweimal aus heißem  $\text{H}_2\text{O}$  umkrystallisiert. Die Elementaranalyse gab folgendes Resultat:

0.0965 g Substanz gaben 0.1912 g  $\text{CO}_2$  und 0.0884 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für Leucin
C .....	54.04	54.96
H .....	10.25	9.92

Die gesamten Krystallisationen wurden mit allen, auch der ursprünglichen Mutterlauge vereinigt, konzentriert, mit Salzsäure gesättigt und nach dem Impfen mit Glutaminsäurechlorhydrat zirka 10 Tage im Eisschrank sich selbst überlassen. Es trat reichliche Abscheidung von Krystallen ein (unter dem Mikroskop Nadeln, durchsetzt mit Blättchen); am Boden des Gefäßes war ein geringer Satz bemerkbar, der aus  $\text{BaCl}_2$  bestand. Deshalb wurde diese Krystallisation, deren Menge 8.16 g betrug, in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, die Lösung von

dem Baryt mittels  $H_2SO_4$  genau befreit, filtriert und die  $H_2SO_4$ - und barytfreie Lösung nach Zusatz von zirka  $10\text{ cm}^3$  konzentrierter  $HCl$  eingedampft.

Die jetzt abgeschiedene Menge Glutaminsäurechlorhydrat betrug  $6\cdot21\text{ g}$ .

Zur Analyse wurde nochmals mit Zuhilfenahme von Tierkohle umkrystallisiert.

$0\cdot2809\text{ g}$  gaben  $0\cdot2238\text{ g}$   $AgCl$ .

In 100 Teilen:

	Berechnet	Gefunden
Cl.....	19·30	19·70

Nach der Abscheidung von Glutaminsäurechlorhydrat wurde die Flüssigkeit zur Entfernung der Hauptmenge  $HCl$  eingedampft, mit  $H_2O$  verdünnt und mit 50% Phosphorwolframsäure die Hexonbasen ausgefällt. Die Fällung wurde mit verdünnter Schwefelsäure chlorfrei gewaschen. Im Filtrat und in den Waschwässern wurde die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Ätzbaryt entfernt, das überschüssige  $Ba(OH)_2$  nach der Filtration mittels  $H_2SO_4$  genau ausgefällt, hierauf im Vakuum konzentriert. Im Destillat war freies Jod nachweisbar.

Nach vollständigem Eindampfen im Vakuum hinterblieben  $43\text{ g}$ . Es wurde nach E. Fischer zweimal verestert und mit  $BaO$  die Ester in Freiheit gesetzt.

Bei der Esterdestillation im Vakuum wurden folgende Fraktionen aufgefangen:

I. Frakt.	Bei	$13\text{ mm}$	Druck,	Temp.	30 bis $40^\circ$ :	Ausbeute	$4\text{ g}$	
II.	»	$13\text{ mm}$	»	»	$40\text{ » }50^\circ$ :	»	$3\text{ g}$	
III.	»	$13\text{ mm}$	»	»	$50\text{ » }110^\circ$ :	»	$15\text{ g}$	
IV.	»	$13\text{ mm}$	»	»	$110\text{ » }140^\circ$ :	»	$5\text{ g}$	
<hr/>							gesamte Ausbeute	$27\text{ g}$

Der im Destillationskolben verbliebene Rückstand betrug  $10\text{ g}$ ; in wenig Alkohol gelöst, gab er mit  $CS_2 + \text{Chlorwasser}$  starke Jodreaktion. Er wurde in  $HCl$  gelöst und eingedampft,

doch zeigte sich zunächst keine Krystallisation. Nach abermaligem Lösen in  $H_2O$  wurde er mit Zinnchlorür erwärmt und das Sn mit  $H_2S$  ausgefällt. Das Filtrat war jetzt bedeutend heller geworden; es wurde mit HCl versetzt und konzentriert. Nach einigen Tagen trat beim Stehen in der Kälte Abscheidung von Krystallen ein, die das Aussehen von Glutaminsäurechlorhydrat hatten. Sie wogen 1·86 g. Die Mutterlauge krystallisierte abermals.

Das vor der Esterdestillation zuerst übergehende Gemisch von Äther und Alkohol wurde mit HCl angesäuert und eingedampft; ein merklicher Rückstand zeigte sich nicht.

Nach der Zersetzung der Esterchlorhydrate mittels  $Ba(OH)_2$  und dem Ausschütteln mit Äther wurde der trockene Rückstand mit HCl angesäuert, mit Alkohol vermischt, filtriert und konzentriert, wobei reichliche Abscheidung von  $BaCl_2$  stattfand. Die Flüssigkeit gab starke Jodreaktion. Vom  $BaCl_2$  wurde abgesaugt, das verdünnte Filtrat genau barytfrei gemacht und konzentriert. Nach zirka einmonatigem Stehen traten Krystalle auf, die abgenutscht und mit kaltem absoluten Alkohol nachgewaschen wurden. Dabei zeigte sich, daß diese Krystalle in Alkohol unlöslich, der anhaftende braune Sirup außerordentlich leicht löslich war. Die Krystalle erwiesen sich als anorganisch.

Der in Alkohol leicht lösliche Sirup krystallisierte nach längerem Stehen in feinen Nadeln, die von den obigen Krystallen völlig verschieden waren und starke Jodreaktion gaben. Infolge ihrer geringen Menge konnten sie nicht untersucht werden.

Die einzelnen Esterfraktionen wurden in folgender Weise verarbeitet:

Fraktion I und II wurden vereinigt und mit der zirka fünf-fachen Menge  $H_2O$  durch Erhitzen am Rückflußkühler während 8 Stunden verseift. Fraktion III und IV wurden gesondert mit  $H_2O$  versetzt und mit Petroläther ausgeschüttelt, diese Äther-extrakte vereinigt und unter Zusatz von HCl eingedampft. Die abgeschiedenen Krystalle wogen, auf Ton getrocknet, 4·81 g.



In 100 Teilen:

	Berechnet für salzsaures Phenylalanin $C_9H_{12}NO_2Cl$	Gefunden
Cl . . . . .	17·50	20·6

Der Chlorgehalt ist also viel höher, als sich für das Phenylalaninsalz berechnet. Ein Teil wurde mit Silberoxyd entchlort. Das Filtrat, konzentriert, gab, mit Kaliumchromat und Schwefelsäure erhitzt, den charakteristischen Geruch nach Phenylacetaldehyd, so daß also die Anwesenheit von Phenylalanin wenigstens qualitativ erwiesen ist.

Die nach der Extraktion mit Petroläther zurückgebliebenen Mengen Ester wurden verseift, und zwar Fraktion III mit  $H_2O$ , Fraktion IV durch Erhitzen mit der vier- bis fünffachen Menge  $Ba(OH)_2$ .

Nach dem Verseifen wurden die vereinigten Fraktionen I und II, ebenso III mit wenig Tierkohle entfärbt, filtriert und fraktionell zur Krystallisation gedampft, bis Alkohol den Rest klar löste.

Die Ausbeute an sich dabei abscheidenden Krystallen betrug in Summa 3·15 g. Die erste Fraktion wurde nach dem Umkrystallisieren analysiert, ebenso die allerletzten zwei Anschüsse.

0·1302 g gaben 0·2571 g  $CO_2$  und 0·1172 g  $H_2O$ .  
0·1633 g » 0·2869 g » » 0·1299 g »

In 100 Teilen:

	Gefunden	
C . . . . .	53·86	47·94
H . . . . .	10·07	8·84

Die ersten Anschüsse enthalten demnach vorwiegend Leucin, die späteren aber auch niedere Aminosäuren.

Der in Alkohol bleibend lösliche, nicht krystallisierende Anteil, rohes Prolin, wog 2·11 g.

Die aus Fraktion IV erhaltene Asparaginsäure wog 0·076 g. Das Filtrat vom asparaginsäuren Baryt, mittels  $H_2SO_4$  genau

vom  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  befreit und mit Tierkohle entfärbt, hinterließ 1·98 g. Nach dem Verwandeln ins Chlorhydrat trat selbst nach längerer Zeit nur geringe Krystallisation auf.

### Hexonbasen.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde, wie schon erwähnt, durch öfteres Anreiben mit verdünnter Schwefelsäure und Absaugen von Salzsäure befreit, dann durch möglichst wenig  $\text{NH}_3$  in Lösung gebracht und in üblicher Weise mit Baryt zersetzt, dann mit Kohlensäure behandelt und zur Vertreibung des Ammoniaks zum Sirup gedampft. Er wurde sodann nach Kossel-Kutscher behandelt. Statt Silbersulfat trugen wir frisch bereitetes Silberoxyd ein. Dieses setzt sich in sehr fein verteiltes Sulfat um und erreicht man hierbei den Endpunkt leichter, als wenn geriebenes Sulfat eingeworfen wird.

Die das freie Lysin enthaltende Fraktion wog, zum Sirup gedampft, 21 g, also außerordentlich viel. Mit alkoholischer Pikrinsäure schied sich ein Harz ab, welches in keiner Weise zum Krystallisieren gebracht werden konnte. In der alkoholischen Lösung blieben 11 g. Auch dieser Anteil krystallisierte nicht.

Infolgedessen wurden beide Fraktionen mit Schwefelsäure zersetzt, die Pikrinsäure durch oftmaliges Ausschütteln mit Äther entfernt und in beiden Flüssigkeiten das Ausfällen mit Phosphorwolframsäure wiederholt.

Die Niederschläge, in bekannter Weise zerlegt und die schließlich resultierenden Sirupe abermals mit Pikrinsäure behandelt, zeigten wiederum nicht die Spur einer Krystallisation, so daß die Anwesenheit von Lysin ausgeschlossen werden kann.

Versuche, mit  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ ,  $\text{AuCl}_3$ , Quecksilberjodidjodkaliumlösung etc. Krystallisation zu erzielen, verliefen negativ. Ein Teil, mit gefälltem  $\text{CuO}$  gekocht, gab starke Blaufärbung, beim Eindampfen jedoch ebenfalls keine Krystalle.

Die Filtrate der zweiten Phosphorwolframsäurefällung wurden mit Baryt zersetzt; schließlich entstanden Krystalle vom Charakter von unreinem Leucin.

Bei der Bestimmung von Histidin und Arginin nach dem modifizierten Kossel-Kutscher-Verfahren fiel schon die Geringfügigkeit der Silber-, beziehungsweise Quecksilberniederschläge auf.

Wir erhielten schließlich eine Krystallisation von Histidinchlorhydrat vom Gewichte 0·02 g und das Arginin berechnete sich nach der Titration mit  $\frac{1}{5}$  n. Salpetersäure mit 0·14 g. Bei der Geringfügigkeit ließ sich nicht konstatieren, ob die Verbindungen wirklich vorliegen.

Zur Ausführung der bekannten Farbenreaktionen wurden 1·5 g Casein, mit der eben notwendigen Menge KOH mit Wasser auf 20  $cm^3$  aufgefüllt, 1·5 g Jodcasein mit 10prozentigem Alkohol gleichfalls auf 20  $cm^3$  gebracht. Zu jeder Reaktion wurde je 1  $cm^3$  der Lösung gebraucht und alle Zusätze ganz gleich gewählt.

Reaktion	Casein	Methylcasein
Biuret . . . . .	violett in gleicher Stärke	
Millon'sche . . . . .	Rotfärbung	keine Reaktion
$\alpha$ -Naphthol . . . . .	violett in gleicher Stärke	
Thymol . . . . .	rot »	» »
Glyoxylsäure . . . . .	violett	stärker violett

Die letzterwähnte stärkere Glyoxylreaktion beim Jodmethylcasein kann allerdings vom Jodgehalt herrühren.

Ferner wurden je  $\frac{1}{10}$  g trockenes Casein und Jodcasein mit je 3  $cm^3$  konzentrierter HCl erwärmt; die Flüssigkeit färbte sich dunkelbraun, doch war die Färbung beim Casein stärker als beim Jodcasein.

Ebenso war beim Erwärmen der 7prozentigen Lösungen mit dem dreifachen Volumen rauchender Salzsäure die beim Casein auftretende Färbung stärker.

Die Methylierung anderer Proteine ist im hiesigen Institut im Gange.